

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.

Tesi di Laurea in

Scienze e Tecnologie Biomolecolari

**Ruolo protettivo dell'acido deidroascorbico contro la tossicità della diossina
nella linea cellulare pancreatica INS-1E.**

Candidato

Relatore

Tiziana Ventroni

Dr. Vincenzo De Tata

INDICE

<u>RIASSUNTO</u>	3
<u>ABSTRACT</u>	4
<u>INTRODUZIONE</u>	5
1) <u>La diossina: storia, struttura e meccanismo d'azione</u>	5
2) <u>Effetti tossici della diossina</u>	9
3) <u>Scopo della tesi</u>	15
 <u>MATERIALI E METODI</u>	
1) <u>Cellule INS-1E</u>	18
2) <u>Preparazione dell'acido deidroascorbico</u>	19
3) <u>Incubazione delle cellule con il DHA</u>	19
4) <u>Dosaggio HPLC dell'acido ascorbico</u>	20
5) <u>SDS PAGE e immunoblotting</u>	20
6) <u>Valutazione della citotossicità della TCDD</u>	21
7) <u>Microscopia elettronica</u>	22
8) <u>Specie reattive dell'ossigeno</u>	22
9) <u>Potenziale di membrana mitocondriale</u>	23

10)	<u>Secrezione di insulina</u>	24
11)	<u>Analisi statistica</u>	25

RISULTATI.

1)	<u>Incremento dei livelli intracellulari di acido ascorbico dopo la preincubazione con acido deidroascorbico</u>	25
2)	<u>Effetto protettivo</u>	26
3)	<u>Effetti di TCDD e DHA sulla produzione di ROS</u>	31
4)	<u>Effetto di TCDD e DHA sul potenziale di membrana dei mitocondri</u>	32
5)	<u>Secrezione di insulina stimolata dal glucosio</u>	32

<u>DISCUSSIONE</u>	34
--------------------------	----

<u>BIBLIOGRAFIA</u>	44
---------------------------	----

RIASSUNTO

Lo stress ossidativo è stato proposto come meccanismo della tossicità della 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD). L'obiettivo di questo lavoro era quello di valutare l'effetto protettivo dell'aumento dei livelli intracellulari di acido ascorbico contro la tossicità acuta della diossina sulla secrezione di insulina delle beta cellule nella linea cellulare INS-1E. L'acido ascorbico è considerato un potente antiossidante, ma il suo effetto è molto limitato dalla sua lenta realizzazione di alti livelli intracellulari. Questo ostacolo potrebbe essere aggirato con la somministrazione dell'acido deidroascorbico (DHA), il quale viene trasportato in elevate quantità e viene trasformato con una rapida riduzione intracellulare, ad ascorbato. In effetti, 30 minuti di incubazione delle cellule INS-1E con diverse concentrazioni di DHA causa un notevole incremento dose-dipendente dei livelli intracellulari di acido ascorbico. La preincubazione delle cellule INS-1E con 0.5 e 1.0 mM di DHA ha dimostrato una maggiore sopravvivenza rispetto alle cellule di controllo dopo un'ora di esposizione con dosi citotossiche di diossina. In queste condizioni sperimentali la diossina sorprendentemente non causa un incremento della produzione di ROS nelle cellule INS-1E, ma induce una depolarizzazione mitocondriale che era significativamente migliorata dalla preincubazione con il DHA. Inoltre la preincubazione con il DHA previene completamente l'inibizione della secrezione di insulina stimolata dal glucosio indotta da basse dosi di diossina. Quindi, i nostri risultati suggeriscono che la preincubazione con il DHA protegge le cellule INS-1E contro la tossicità acuta della diossina preservando parzialmente la funzione mitocondriale.

ABSTRACT

Oxidative stress has been proposed as a mechanism of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). The aim of this research was to evaluate the protective effects of increased intracellular ascorbate levels against TCDD acute toxicity in the insulin-secreting B-cell line INS-1E. Ascorbate is considered a potent antioxidant, but its therapeutic efficacy is greatly limited by its slow achievement of high intracellular levels. This might be circumvented by administration of dehydroascorbate (DHA), which is transported at a much higher rate and undergoes rapid intracellular reduction to ascorbate. Indeed, 30 min incubation of INS-1E cells with various concentrations of DHA caused a remarkable, dose-related increase of the intracellular ascorbate levels. INS1E cells preincubated with 0.5 and 1.0 mM DHA showed a greater viability than control cells after 1 hr exposition to cytotoxic TCDD concentrations. In our experimental conditions, TCDD surprisingly failed to increase ROS production in INS-1E cells, but induced a mitochondrial depolarization which was significantly improved by DHA preincubation. Furthermore, DHA preincubation completely prevented the low dose TCDD-induced inhibition of glucose-stimulated insulin secretion. Thus, our results suggest that DHA preincubation protects INS-1E cells against TCDD acute toxicity by partially preserving mitochondrial function.

INTRODUZIONE

La diossina: storia, struttura e meccanismo d'azione.

Il termine diossina è comunemente usato per riferirsi ad una famiglia di sostanze chimiche tossiche strutturalmente correlate, con un comune meccanismo d'azione ed un comune spettro di risposte. Questa famiglia comprende i cosiddetti composti diossino-simili ovvero: dibenzo-p-diossine policlorurate (PCDDS), dibenzo-furani policlorurati (PCDFs) e bifenili policlorurati (PCBs). Fra tutti questi composti la sostanza più tossica è la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina, nota più semplicemente come diossina o TCDD (Poland and Knudson, 1982; Whitlock, 1990; Matsumura 1995).

Le diossine sono contaminanti ambientali che si formano come prodotti secondari in processi industriali quali l'incenerimento dei rifiuti, lo sbiancamento della carta e della polpa di legno e la produzione di pesticidi, erbicidi e fungicidi (Giplin et al., 2003).

Queste sostanze non erano presenti nell'ambiente prima dell'industrializzazione se non in piccole quantità dovute alla naturale combustione e ai processi geologici. Oggi questi composti si ritrovano in tutti gli esseri umani, con livelli più alti nelle persone che vivono nei paesi più industrializzati, le quali risultano esposte a bassi livelli di PCDDs/PCDFs attraverso il cibo, l'acqua, l'atmosfera ed il suolo, e non solo a seguito di esposizione accidentale o dovuta al lavoro in siti a rischio (Kokichi Arisawa et al., 2005). Le diossine vengono rilasciate nell'aria per poi ricadere come ceneri. Quando un animale mangia del cibo contaminato introduce queste sostanze nella catena alimentare. E' stato stimato che il 90% dell'esposizione umana alla TCDD proviene dall'alimentazione: la fonte principale è rappresentata da animali che sono esposti primariamente alle emissioni di diossina che si

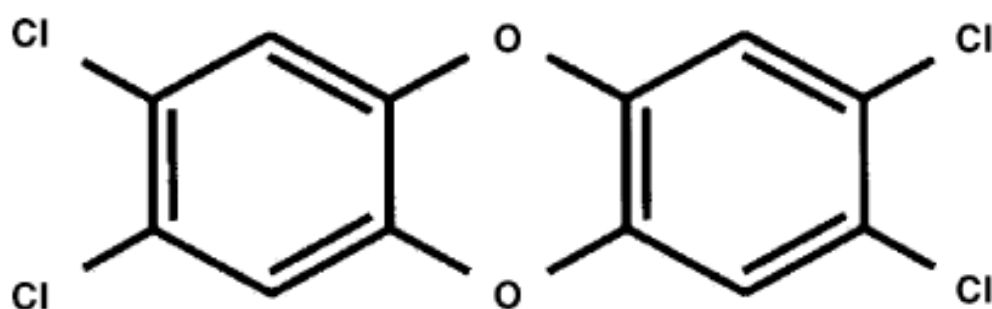
depositano sulla superficie del suolo, delle piante e dell'acqua. L'uomo assume poi la TCDD attraverso il consumo di carne, latte, pesce e uova. Questo determina un'esposizione continua a bassi livelli di TCDD che, a lungo andare, si accumula nell'organismo determinando effetti dannosi per la salute (Svensson et al., 1991).

Le diossine sono composti biologicamente ed ambientalmente persistenti: basti pensare che l'emivita della più tossica delle diossine, ovvero la TCDD, nei roditori è di circa 2-4 settimane (Rose et al., 1976; Olie, 1980) ma nell'uomo è stata stimata un'emivita di 7-11 anni, sia pure con notevoli variazioni individuali. Recenti studi di farmacocinetica hanno dimostrato che l'emivita della diossina è dose dipendente e inoltre varia in base alla composizione del corpo: una maggiore presenza di tessuto adiposo determina, infatti, un aumento dell'accumulo e quindi una maggiore persistenza (Schechter et al., 2006). Ciò è dovuto alla natura lipofila della TCDD, che ne permette il passaggio naturale attraverso le membrane cellulari e il deposito in vari organi, in particolare nel tessuto adiposo e nel fegato (Arisawa et al., 2005). Durante la guerra del Vietnam, tra il 1962 e il 1970, è stata ampiamente utilizzata, come defoliante una miscela 1:1 di acido 2,4-diclorofenossiacetico e acido 2,4,5-triclorofenossiacetico detta Agent Orange contenente da 2 a 30 ppm di TCDD (ATSDR, 1999). Negli studi condotti su alcuni veterani americani che furono esposti all'Agent Orange si sono riscontrati livelli di TCDD nei lipidi sierici superiori a 600 ppt, parecchi anni dopo aver lasciato il Vietnam, mentre i livelli di TCDD riscontrati nella popolazione non esposta non superavano 1-2 ppt. In Vietnam i livelli di diossina riscontrati nel suolo delle aree contaminate dal defoliante sono superiori a 1000000 ppt, dopo oltre 30 anni dalle operazioni militari americane con l'Agent Orange; inoltre elevati livelli di diossina sono stati rilevati nel cibo, nella flora, nella fauna e negli stessi vietnamiti che

vivevano nelle aree colpite (Schechter et al., 2006). I PCDFs e PCBs furono coinvolti nell'avvelenamento dell'olio di riso in Giappone nel 1968 (Masuda, 2003) e, per lo stesso motivo a Taiwan nel 1979 (Rogan et al., 1988; Guo et al., 2003). Famosa è stata in Italia, a Seveso, la contaminazione di diossina nel 1976 a seguito dell'esplosione di un'industria chimica. In quell'occasione si produssero alcuni chilogrammi di diossina che contaminò l'ambiente e fu responsabile della morte di numerose forme di vita sia della flora che della fauna circostante l'insediamento industriale. Benché un numero consistente di individui, sia adulti che bambini, fossero venuti a contatto con la sostanza chimica, per molti anni non si sono riscontrati effetti gravi sulla salute. Studi più recenti hanno tuttavia evidenziato un innalzamento dell'incidenza dei tumori nella popolazione che viveva nelle zone più esposte alla diossina sprigionata con l'esplosione (Bertazzi et al., 1998; Consonni 2008). Recentemente la diossina è tornata alla ribalta delle cronache per il caso di avvelenamento del Presidente ucraino Victor Yushchenko nel 2004.

In Europa nell'ultimo secolo si è verificato un costante aumento dell'esposizione della popolazione a questi prodotti, che ha raggiunto un picco negli anni '50 e '60 per poi diminuire. Altri due picchi si sono avuti negli anni '80 '90 il primo dovuto all'incremento dell'industria della carta, il secondo dovuto alle emissioni poco controllate provenienti dagli inceneritori dei rifiuti. Quanto riguarda in particolare l'Italia, la situazione appare piuttosto grave. Infatti secondo i dati contenuti nell'ultimo rapporto della Commissione dell'Unione Europea sul rilascio di diossine e furani al suolo risalente al 1999, l'Italia risulta il maggior produttore di diossina in Europa: ne emette il 38 per cento in più della Spagna, in 33 per cento in più della Gran Bretagna, il 29 per cento in più della Germania e il 75 per cento in più di Danimarca, Finlandia, Norvegia, e Svezia messe insieme. L'Associazione Medici per l'Ambiente, tenendo conto

della contaminazione ormai diffusa uniformemente in tutti i paesi industrializzati e della notevole persistenza di questi composti nell'ambiente ha parlato addirittura, riferendosi all'inquinamento da diossina, di "pandemia silenziosa". Negli ultimi anni la situazione sembra addirittura aver subito un peggioramento, come dimostrano il caso ormai tristemente noto anche a livello internazionale dell'emergenza rifiuti in Campania e per fare un esempio più vicino alla nostra realtà regionale, anche se di dimensioni assai più ridotte, quello dell'inceneritore di Montale nel pistoiese. La situazione è resa ancora più grave dal fatto che nelle zone a rischio si producono alimenti che vengono poi distribuiti a livello nazionale, diffondendo così la possibile contaminazione anche ben al di là delle zone di emissione della diossina. A questo proposito è interessante ricordare che in Toscana, presso il Dipartimento Provinciale ARPAT di Firenze è presente uno dei cinque laboratori nazionali individuati dall'Istituto Superiore di Sanità per monitorare i livelli di contaminazione da diossine negli alimenti ed è stata anche istituita una "Unità di crisi" per l'emergenza diossina con il compito di curare i rapporti e il coordinamento delle attività con le autorità competenti. La struttura chimica della 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina è la seguente:



2,3,7,8 – Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD)

È stato stabilito con certezza che, una volta attraversata la membrana citoplasmatica grazie alla sua elevata lipofilità, la diossina si lega ad una particolare proteina citosolica, conosciuta come recettore arilico (AhR) (Bradfield et al., 1991; Mandal 2005). Questo recettore è un membro della famiglia delle proteine bHLH/PAS (basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim) noti regolatori trascrizionali, ed è coinvolto nell'organogenesi, nella detossificazione di endo - ed xeno - biotici e in diverse risposte organo-specifiche indotte dalla diossina. I tipici ligandi sono gli idrocarburi arilici (dai quali prende il nome), gli idrocarburi arilici alogenati, come la diossina, e numerosi costituenti vegetali introdotti con l'alimentazione. Non è ancora noto con certezza quale sia il ligando fisiologico del recettore arilico.

Una volta avvenuto il legame della diossina con AhR, il complesso trasloca nel nucleo dove dimerizza con Arnt (Ah receptor nuclear translocator) un'altra proteina bHLH, che normalmente si trova libera nel nucleo (Mandal, 2005). A seguito di questa dimerizzazione si forma un complesso trascrizionalmente attivo che si lega ad un sito specifico (sequenza 5'-TNGCGTG-3'), presente nel promotore di diversi geni bersaglio, noto come elemento di risposta agli Xenobiotici (XRE) o, nel caso specifico della diossina, DRE (Dioxin Response Element) (Denison et al., 1988). Viene così attivata la trascrizione di geni che codificano per enzimi coinvolti nelle biotrasformazioni e nella regolazione di sviluppo, proliferazione e differenziamento cellulare (Bock and Kohle, 2006). Una modulazione inappropriata dell'espressione genica potrebbe pertanto rappresentare il passo iniziale di una serie di cambiamenti biochimici, cellulari e tissutali che sarebbero responsabili della tossicità osservata.

Effetti tossici della diossina.

I dati relativi ai possibili rischi dell'esposizione alla diossina per l'uomo derivano dallo studio degli effetti osservati nei casi di esposizione accidentale. Probabilmente l'aspetto più inusuale dell'azione tossica della diossina è quello di produrre una grande varietà di risposte, alcune delle quali si manifestano già a basse dosi e durano per lunghi periodi di tempo, per cui risulta assai difficile individuare chiaramente un meccanismo d'azione comune che possa spiegare i suoi numerosi effetti tossici nei diversi tipi di tessuto (Matsumura, 1994; Matsumura, 2003).

Brevemente i principali effetti tossici derivanti dall'esposizione alla diossina possono essere così riassunti:

-Cloracne: è una grave forma di acne, più sfigurante della normale acne giovanile, che perdura anche anni dopo l'esposizione e la prima comparsa (Bertazzi et al., 1998). Si manifesta con eruzioni cutanee e pustole simili a quelle dell'acne giovanile, però con possibile localizzazione estesa all'intera superficie corporea e con manifestazioni protratte, nei casi più gravi, per molti anni. La cloracne rappresenta un disordine ipercheratosico della cute che interessa i follicoli piliferi, le ghiandole sebacee e l'epidermide interfollicolare. Questa è la patologia più chiaramente evidente nelle persone esposte sin dal 1957 quando la diossina venne identificata come causa della cloracne (Poland and Knudson, 1982), fino alla recente notizia di avvelenamento del presidente ucraino Viktor Yushchenko, nel 2004. Si ritiene generalmente che AhR giochi un ruolo importante, sebbene ancora non chiarito nei dettagli, negli stadi terminali della differenziazione dei cheratinociti.

-Wasting syndrome (sindrome da perdita di peso corporeo): uno dei più comuni sintomi osservati nelle specie animali a seguito di avvelenamento da

TCCD è la cosiddetta “wasting syndrome” (sindrome da perdita di peso corporeo), che coinvolge soprattutto il tessuto adiposo (Nishiumi, 2008) e quello muscolare (Max , Silbergeld, TOXICOL. APPL. PHARMACOL, 1987). Negli animali trattati con la diossina, la wasting syndrome si sviluppa lentamente fino a portare alla morte, nel caso di una perdita di peso corporeo superiore al 50%. Negli animali trattati con TCDD sono state osservate numerose alterazioni del metabolismo lipidico: aumento della mobilizzazione dei grassi dal tessuto adiposo (Pohianvirta et al., 1990), della loro ossidazione (Muzi et al., 1989) e della chetogenesi (Lakshman et al., 1991), diminuzione della sintesi ex novo dei grassi e aumento dei livelli plasmatici dei trigliceridi (Lakshman et al., 1988). È noto inoltre che la diossina è in grado di causare una drastica diminuzione dell’attività della lipoproteina lipasi (LPL) (Brewster and Matsumura, 1984). L’esposizione alla diossina causa inoltre un’incapacità del glucosio di indurre sintesi proteica negli adipociti (Enan et al., 1992a; 1992b). Questo effetto della diossina sembrerebbe riconducibile alla sua capacità di inibire l’uptake del glucosio attraverso una riduzione del numero e/o dell’attività dei trasportatori del glucosio GLUT4 e GLUT2 (Enan et al., 1992a; 1992b.) Recentemente, (Lindèn et al., 2005) è stato anche dimostrato che nel ratto la somministrazione di diossina è in grado di modificare a livello ipotalamico l’espressione di geni coinvolti nella regolazione dell’assunzione di cibo e del metabolismo (Lindèn, 2005). Nel loro insieme tutte queste modificazioni potrebbero contribuire alla realizzazione del quadro clinico tipico della wasting syndrome.

-Effetti sul sistema digestivo: gli idrocarburi aromatici clorurati producono lesioni iperplastiche ed ipertrofiche a livello della mucosa gastrointestinale con manifestazioni emorragiche e necrotiche più o meno gravi. La TCDD e i composti correlati producono epatomegalia in tutte le specie studiate, anche a basse dosi (Mitrou et al., 2001).

-Immunosoppressione: il sistema immunitario è stato per lungo tempo considerato un bersaglio preferenziale della tossicità della diossina (Mitrou et al., 2001; Schecter et al., 2006). In tutte le specie studiate, la diossina ha prodotto un importante effetto immunosoppressivo che si manifesta come diminuzione della resistenza alle infezioni e delle risposte immunitarie umorali e cellulo-mediate. Oltre all'immunosoppressione, la diossina promuove le risposte infiammatorie come risulta da un aumento della produzione di citochine infiammatorie come interleuchina-1 e il fattore di necrosi tumorale (TNF- α) (Kerkvliet, 1995). Assai recentemente è stato inoltre dimostrato che la stimolazione del recettore arilico AhR da parte di diversi ligandi, fra i quali la diossina, è in grado di modulare in maniera significativa i processi di differenziazione di sottopopolazioni di linfociti T (T_{reg} e Th_{17}) potendo così contribuire all'instaurarsi di fenomeni autoimmunitari nell'organismo (Quintana, 2008; Veldhoen 2008).

-Funzione renale: in alcune specie, in seguito all'esposizione con TCDD, il rivestimento epiteliale del tratto urinario aumenta in spessore di due o tre volte rispetto al normale con una conseguente diminuzione della porzione glomerulare deputata alla filtrazione (Mitrou et al., 2001).

-Sistema riproduttivo: l'esposizione cronica alla diossina danneggia la riproduzione. Nei maschi causa una diminuzione della spermatogenesi, delle dimensioni dei testicoli e una degenerazione dei tubuli seminiferi (Mitrou et al., 2001). Dopo il disastro di Seveso è stata osservata, nella prole dei maschi esposti, una riduzione del rapporto maschi/femmine (Kogevinas , 2001).

Nelle donne esposte alla TCDD, lesioni morfologiche sono state osservate nell'utero e nelle ovaie; inoltre i livelli di progesterone ed estrogeni nel sangue risultano significativamente diminuiti (Mitrou et al., 2001). Altre osservazioni

suggeriscono che la TCDD può indurre danni all'embrione, con conseguenti malformazioni e morte fetale (Poland and Knudson , 1982). A proposito degli effetti dell'esposizione alla diossina sullo sviluppo e la funzione del sistema riproduttivo è interessante ricordare che recentemente è stata ampiamente dimostrata l'esistenza di importanti interazioni ("cross-talk") fra le vie di trasduzione del segnale mediate dal AhR e quelle degli estrogeni (Boverhof et al., 2006; Ohtake et al., 2003).

(Beischlag , Perdeu 2005;Brunnberg et al., 2003; Ohtake et al., 2008).

-Sistema nervoso: l'esposizione a basse dosi di diossina può essere associata a deficit comportamentali e neurologici, in modo particolare se l'esposizione avviene durante lo sviluppo. La neurotossicità dei PCB è stata riportata nell'uomo e confermata in parecchie specie da laboratorio (Tilson and Kodavanti, 1997). L'esposizione di animali adulti ad una singola dose di PCBs fa diminuire i livelli di diversi neurotrasmettitori nel cervello, mentre esposizioni ripetute a basse dosi di PCBs sembrano compromettere il metabolismo della dopamina cerebrale (Tilson and Kodavanti 1997).

-Cancerogenesi: le diossine non sono considerate propriamente mutageniche in assenza di sicure evidenze sperimentali al riguardo (IARC, 1997). Nonostante ciò, esperimenti su animali trattati con alte dosi di diossina e studi su popolazioni umane altamente esposte, hanno mostrato che questi composti determinano un incremento del rischio di ammalarsi di cancro (WHO, 1997). Nel ratto, la diossina induce neoplasie nei polmoni, nelle cavità nasali e orali, nella tiroide e nel fegato (Huff E. et al., 1991). Per quanto riguarda l'uomo, recentemente il Department of Health and Human Services degli Stati Uniti ha classificato la diossina fra le sostanze sicuramente cancerogene (NTP, 2004). A questo proposito può essere interessante ricordare che confrontando le

concentrazioni di TCDD nei tessuti di animali trattati che sviluppavano tumori e in quelli di una popolazione altamente esposta (ad esempio in seguito ad incidenti industriali) nella quale era aumentato il rischio di cancro si è trovata una certa similarità dei valori ottenuti (Mitrou et al., 2001).

Anche studi recenti dall'Air Force Health Study, nell'arco di 20 anni, sui veterani responsabili durante la guerra del Vietnam dello spargimento aereo dell'Agent Orange, per controllarne lo stato di salute, hanno rivelato che la tendenza in questi individui a sviluppare tumori era maggiore di quella dei veterani che non erano entrati in contatto con il defoliante (Mitrou et al., 2001).

La mortalità dovuta al cancro è stata esaminata anche a Seveso dove l'incidenza di alcuni tipi di cancro (come quelli dell'apparato digerente e del sangue) è risultata aumentata in seguito al disastro mentre per altri tipi è diminuita (Bertazzi et al., 1999).

-Diabete: Numerosi studi epidemiologici hanno ripetutamente dimostrato l'esistenza di una correlazione positiva fra esposizione alla diossina e insorgenza del diabete di tipo 2 (Henriksen et al., 1997; Bertazzi et al., 1998; Longnecker and Michalek, 2000; Bertazzi et al., 2001; Kim et al., 2003; Fierens et al., 2003; Lee et al., 2006; Fujiyoshi et al., 2006; Kang et al., 2006; Ringnell-Hydbom et al., 2007; Lee et al., 2007; Everett et al., 2007;). A questo proposito è anche utile ricordare che le caratteristiche relative all'alta diffusione e all'elevata persistenza della diossina nell'ambiente la fanno ritenere al momento attuale forse l'unico contaminante ambientale capace di causare effetti diffusi sulla popolazione generale (Longnecker and Daniels, 2001) in particolare va ricordato che la diossina e le sostanze ad essa correlate fanno parte di una categoria di contaminanti ambientali noti come "persistent organic pollutants" (inquinanti organici persistenti). Queste sostanze, grazie

alla loro lipofilicità e alla loro elevata resistenza alla degradazione, risultano presenti, a basse concentrazioni, nel grasso di molti alimenti (Schafer and Kegley , 2002; Mullerowà, Kopeckj 2007).

Per questo motivo questi inquinanti possono raggiungere praticamente tutti gli individui di una popolazione e pertanto, anche se fossero associati ad un rischio di indurre diabete molto basso a livello individuale, potrebbero comunque manifestare effetti significativi a livello dell'intera popolazione (Porta and Zumeta, 2002).

Scopo della tesi.

Fra i molti aspetti dell'azione tossica della diossina quello che ha attirato maggiormente la nostra attenzione è stato quello relativo alla possibile azione diabetogenica di questa sostanza. La relativa scarsità di lavori sperimentali riguardanti gli effetti della diossina sulla funzione endocrina del pancreas ci ha convinti ad approfondire questo aspetto, per cercare di individuare, alla luce dei risultati ottenuti, una base biologica plausibile a sostegno delle osservazioni epidemiologiche precedentemente ricordate.

Il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio internato di tesi aveva precedentemente iniziato questo lavoro utilizzando un modello di somministrazione in vivo della diossina nel ratto. Gli animali sono stati trattati con una singola dose di diossina ($1\mu\text{g/kg}$ per via i. p.), largamente inferiore alla dose letale che per i ratti è pari a circa $125\mu\text{g/kg}$. Dopo 24 ore dal trattamento i ratti sono stati sacrificati e le isole pancreatiche sono state isolate e incubate in un tampone contenente diverse concentrazioni di glucosio, in modo da valutarne la capacità di produrre e secernere insulina. I risultati ottenuti (Novelli et al., 2005) hanno dimostrato che le isole isolate dai ratti trattati con

diossina conservano la capacità di secernere insulina quando vengono stimulate dal glucosio, ma che tale secrezione è significativamente ridotta rispetto ai controlli. Questa riduzione della capacità secretoria si associa ad una diminuzione della captazione del glucosio da parte delle cellule pancreatiche non riconducibile direttamente ad una diminuzione della quantità dei trasportatori specifici per il glucosio (GLUT-2) valutata con tecniche di immunoblotting. Questi esperimenti hanno permesso di concludere che la diossina, somministrata in vivo a basse dosi, è in grado di indurre rapidamente un danno specifico della funzionalità secretoria del pancreas endocrino del ratto.

Successivamente l'indagine è proseguita utilizzando come modello sperimentale la linea cellulare INS-1E. Queste cellule derivano da un'insulinoma di ratto indotto con raggi X e conservano la fondamentale caratteristica di secernere insulina in maniera dose dipendente in seguito a stimolazione con glucosio. Queste proprietà fanno sì che le cellule INS-1E siano generalmente considerate un ottimo modello sperimentale per lo studio in vitro delle cellule β del pancreas (Asfari et al., 1992; Merglen et al., 2004).

I primi esperimenti condotti utilizzando questo modello sperimentale in vitro hanno permesso di dimostrare che la diossina è particolarmente tossica per le cellule INS-1E, anche a dosi molto basse (Piaggi et al., 2007). Dopo 1 ora di esposizione a concentrazioni di TCDD comprese fra 12.5 e 25 nM, è stato infatti osservato un drammatico declino della sopravvivenza cellulare (meno del 20% delle cellule restano vitali). L'osservazione al microscopio elettronico delle cellule esposte alla diossina ha permesso di dimostrare che la morte delle cellule β era caratterizzata a livello ultrastrutturale da estesi fenomeni di degranulazione, dalla comparsa di numerosi vacuoli autofagici e da condensazione periferica della cromatina nucleare. Le dosi citotossiche di TCDD

(12.5 e 25 nM) si sono inoltre rivelate capaci di far aumentare drasticamente, nel giro di pochi secondi, i livelli intracellulari di calcio. Ciò gioca probabilmente un ruolo importante nel meccanismo dell'azione tossica della diossina, in quanto, se si blocca l'ingresso del calcio nella cellula mediante l'aggiunta del chelante EGTA al mezzo di coltura, l'effetto citotossico della TCDD si riduce significativamente. Esperimenti di citofluorimetria hanno permesso anche di dimostrare che le concentrazioni citotossiche di TCDD inducono una rapida depolarizzazione dei mitocondri con probabile alterazione della funzione. Un altro risultato, di particolare interesse in vista del potenziale ruolo diabetogenico della diossina, consiste nell'osservazione che 1 ora di esposizione delle cellule INS-1E a concentrazioni molto basse di TCDD (0.05-1nM), prive di effetti citotossici, è in grado comunque di inibire quasi completamente la secrezione di insulina stimolata dal glucosio. Nel loro insieme quindi queste osservazioni confermano che le cellule β del pancreas possono costituire un bersaglio specifico e assai sensibile dell'azione tossica della diossina, che può influenzare a seconda della dose, la funzione e/o la sopravvivenza di tali cellule.

È stato proposto che l'azione tossica della diossina derivi dalla sua capacità di aumentare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei tessuti. È stato infatti dimostrato che l'esposizione alla TCDD causa stress ossidativo in molti tessuti (Shertzer et al., 1998; Slezak et al., 2000; Kern et al., 2002;). In particolare, è stato osservato che la TCDD può far aumentare la produzione intramitocondriale di ROS (Senf et al., 2002a), probabilmente attraverso una modificazione del rapporto GSSG/GSH (Shen et al., 2005; Shertzer et al., 2006). Questo meccanismo risulta di particolare interesse per le cellule β pancreatiche che sono considerate un facile bersaglio per lo stress ossidativo a causa della loro limitata dotazione di difese antiossidanti (Kaneto et al., 2006).

Sulla base di queste considerazioni ci è sembrato interessante studiare l'eventuale effetto protettivo nei confronti della tossicità da diossina di un noto antiossidante: l'acido deidroascorbico (DHA).

MATERIALI E METODI

CELLULE INS-1.

La linea cellulare stabile INS-1 E, derivante da un adenoma beta cellulare di ratto indotto con raggi X, è ben differenziata e produce e secerne insulina in maniera regolata dal glucosio (Asfari et al., 1992). Le cellule INS-1E sono state fornite al nostro laboratorio dal Prof. C. B. Wollheim dell'Università di Ginevra e sono state coltivate in mezzo di coltura RPMI 1640 con l'aggiunta del 10% di siero fetale bovino inattivato (Fetal Calf Serum, FCS), 1 mM di piruvato di sodio, 50 μ M di 2-mercaptoetanolo, 2 mM di L-glutamina, 10mM di HEPES, 100U/L penicillina e 100 μ g/ml di streptomicina. L'aggiunta del 2-mercaptoetanolo al mezzo di coltura è considerata necessaria per la crescita ottimale delle cellule, in quanto tale agente riducente potenzia le ridotte difese antiossidanti delle cellule INS-1E che sono simili anche in questo alle normali cellule β pancreatiche che notoriamente posseggono bassi livelli di attività enzimatiche antiossidanti (Lenzen et al., 1996; Tiedge et al., 1997). Le cellule sono state mantenute in incubatore in un'atmosfera satura di umidità e con CO₂ al 5%. Le cellule crescono formando uno strato monocellulare e di solito vengono utilizzate a confluenza del 70-80%. La coltura di mantenimento è stata passata una volta alla settimana con una delicata tripsinizzazione, e le cellule sono state seminate con una densità di 4×10^4 cellule/cm², i.e. 3×10^6 cellule, in Falcon da 75 cm² contenenti 10ml di terreno.

PREPARAZIONE DELL'ACIDO DEIDROASCORBICO.

Il DHA è stato preparato immediatamente prima del suo utilizzo mediante l'ossidazione dell'acido ascorbico. Soluzioni di acido ascorbico 100mM in acqua bidistillata sono state trattate prima con bromo liquido e successivamente con N₂ in modo da rimuovere completamente il bromo in eccesso e da promuovere l'ossidazione dell'acido ascorbico. La soluzione finale di DHA è stata quindi conservata al buio a 4°C fino al momento della diluizione in tampone di incubazione.

INCUBAZIONE DELLE CELLULE CON IL DHA.

Le cellule sono state seminate in piastre p60, ad una densità di 4×10^4 cellule/cm². Dopo 48 ore, sono state lavate 2 volte con tampone PBS, e incubate per 10, 20 o 30 minuti a 37°C in terreno contenente DHA 0.1, 0.5 o 1.0 mM, oppure acido ascorbico 1.0 mM. Al termine del periodo di incubazione le cellule sono state lavate due volte con tampone PBS e quindi incubate in TCA (acido tricloroacetico) 5% (v/v) per 20 minuti a 4°C. Successivamente l'estratto acido così ottenuto è stato recuperato e conservato a -20°C fino al momento del dosaggio dell'acido ascorbico. Le proteine sono state raccolte in NaOH 0.1 M e successivamente dosate, con tecnica spettrofotometrica utilizzando il kit commerciale "BICINCHONINIC ACID PROTEIN ASSAY KIT" (Sigma).

DOSAGGIO HPLC DELL'ACIDO ASCORBICO.

Nei campioni derivanti dall'estrazione acida la quantità di acido ascorbico è stata misurata tramite HPLC secondo il metodo descritto da Rose e Bode (1995). I campioni sono stati analizzati con un sistema per HPLC a fase inversa

equipaggiato con una colonna C18 (Synergi; Phenomenex, USA) e con un detector elettrochimico (Coulchem 3-ESA) collegato ad una cella analitica (Modello 5011-ESA). I potenziali utilizzati erano di -0.35 Volt al primo elettrodo e $+0.2$ Volt al secondo elettrodo. La fase mobile era un tampone KH_2PO_4 0.2 M, pH 3, con un flusso costante di 1 ml/min. Il software che correda lo strumento restituisce i tracciati della separazione del campione e l'integrazione dell'area dei picchi presenti in tali tracciati. Prima di ogni serie di misurazioni, standard di acido ascorbico a diverse concentrazioni, preparati in fase mobile, sono stati analizzati in modo da poter allestire una retta di taratura che correlasse l'area del picco con la relativa concentrazione. Eventuali diluizioni dei campioni da analizzare sono state effettuate in fase mobile. I valori ottenuti per gli estratti intracellulari sono stati normalizzati per la concentrazione proteica del campione.

SDS PAGE e immunoblotting.

La separazione elettroforetica su gel di poliacrilamide (SDS PAGE) è stata condotta secondo il metodo descritto da Laemmli (1970) usando una concentrazione di poliacrilamide del 5 e del 15% rispettivamente per stacking e separating gels. Le proteine sono poi state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad Laboratories) secondo il metodo di Towbin et al., (1979). L'immunoblotting è stato effettuato utilizzando una I_gG di coniglio specifica per la GSTO1 (preparata come descritto in Paolicchi et al., 1996), mentre il sistema di rilevazione si è avvalso di un anticorpo anti I_gG di coniglio marcato con perossidasi (Sigma Chemical Co.) e di una soluzione di fenolo(ECL kit, Amersham) come substrato. L'analisi densitometrica è stata eseguita utilizzando il software Quantity One 4.3.1 (Bio-Rad Co.).

VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITA' DELLA TCDD.

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ad una densità di 4×10^4 cellule/cm². Dopo 48 ore, le cellule sono state incubate per 1 ora in mezzo di coltura fresco contenente diverse concentrazioni di TCDD (0,12,25,50 nM,rispettivamente). La sopravvivenza cellulare dopo 1 ora di esposizione alla TCDD è stata valutata sulla base dell'idrolisi del sale di tetrazolio WST-1 da parte delle deidrogenasi mitocondriali, utilizzando un kit disponibile in commercio (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostic, Germania.) L'assorbanza a 440 nm è stata misurata in lettore di piastre Elisa Wallac 1420 (Perkin Elmer).

Un protocollo simile è stato eseguito nel caso degli esperimenti di protezione ma le cellule, prima dell'esposizione alla TCDD, sono state preincubate per 30 minuti in mezzo fresco contenente acido deidroascorbico (DHA) 0.5 o 1.0 mM.

MICROSCOPIA ELETTRONICA.

Le cellule dopo 30 minuti di preincubazione in mezzo fresco contenente 1 mM DHA e dopo un'ora di esposizione a diverse concentrazioni di TCDD, sono state fissate in glutaraldeide (2.5% in tampone fosfato 0.1 M) per 20 minuti a temperatura ambiente. Le cellule sono state poi lavate in tampone fosfato 0.1 M, PH 7.3, sottoposte a post-fissazione in tetrossido di osmio (0.1% in tampone fosfato 0.1 M) e infine deidratate nella serie crescente degli alcoli. Nella fase finale della deidratazione, le cellule sono state raccolte meccanicamente mediante scraping e concentrate mediante centrifugazione. I pellets cellulari così ottenuti sono stati rapidamente trasferiti in ossido di propilene ed infine

inclusi in PolyBed 812. Le sezioni ultrasottili, ottenute utilizzando un ultramicrotomo con lama di diamante, sono state colorate con acetato di uranile e citrato di piombo ed osservate con un microscopio elettronico Zeiss 902.

SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO.

La formazione di ROS è stata quantificata mediante la somministrazione alle cellule di due differenti probes fluorescenti: Diidrorodamina 123 (DHR, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) e DCFH-DA (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

A) Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti con una densità di 4×10^4 cellule al cm^2 . Dopo 48 ore, le cellule sono state precaricate con 5 μM di DHR a 37°C per 20 minuti. Dopo l'aggiunta della diossina, la fluorescenza dei campioni è stata poi letta ogni 5 minuti per 1 ora usando uno spettrofotometro Victor 1420 a scansione multipla (Perkin Elmer). L'eccitazione e l'emissione avevano lunghezze d'onda di 485 nm e 595 nm, rispettivamente. La generazione di ROS dopo un'ora è stata calcolata sottraendo alla fluorescenza misurata dopo 1h la fluorescenza di base.

B) Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti con una densità di 4×10^4 cellule/ cm^2 . Dopo 48 ore, sono state precaricate con 10 μM di DCFH-DA e poi è stata aggiunta la diossina. I segnali sono stati registrati ogni 30 minuti per 2 ore con uno spettrofotometro Victor 1420 a scansione multipla (Perkin Elmer). L'eccitazione e l'emissione hanno lunghezze d'onda di 485 nm 535 nm, rispettivamente.

In entrambi i casi, la produzione di ROS indotta dall'acqua ossigenata è stata usata come controllo positivo.

POTENZIALE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE. Per la misurazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) nelle cellule INS-1, abbiamo impiegato, come consigliato da Jayaraman 2005, il colorante fluorescente tetrametilrodamina-metil-estere (TMRE, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), che si accumula all'interno della membrana mitocondriale secondo il potenziale di membrana mitocondriale. Una diminuzione del potenziale di membrana può essere osservato con il citofluorimetro come decremento del segnale registrato nel canale FL-2, espresso in scala logaritmica. Brevemente, le INS-1 sono state delicatamente staccate con PBS freddo, risospese (1×10^6 cellule/ml) in buffer KRBH con l'aggiunta di 2.8mM di glucosio e preincubate con 25 nM di TMRE per 15 minuti a 37° C, prima di essere esposte alla diossina. Il potenziale di membrana mitocondriale è stato misurato prima e 10 minuti dopo l'esposizione alla diossina, con un Becton-Dickinson Facscan equipaggiato con un software Cell Quest .

SECREZIONE DI INSULINA.

La risposta secretoria delle cellule INS-1 al glucosio è stata valutata in cellule con passaggi in coltura fra 54 e 95. Per questi esperimenti le cellule sono state coltivate in piastre a 24 pozzetti nelle quali venivano seminate ad una densità di 4×10^4 cellule/cm². Dopo 48 ore le cellule sono state preincubate per 30 minuti in mezzo fresco contenente 1mM DHA e poi esposte per 1 ora a 1 nM di TCDD. Le cellule sono state poi lavate due volte con tampone Krebs-Ringer bicarbonato (KRBH) supplementato con 0.5% albumina sierica bovina (frazione

V, Sigma) e glucosio 2.8 mM e poi incubate per 1 ora a 37°C in tampone KRBH contenente glucosio 2.8 o 8.3 mM. Dopo 1 ora di incubazione, il tampone è stato raccolto per effettuare il dosaggio dell'insulina secreta. La quantità di insulina è stata determinata mediante radioimmunosaggio secondo Herbert et al. (1965). Il principio del dosaggio si basa sulla competitività nell'occupare i siti leganti dell'anticorpo anti-insulina (aggiunto durante il dosaggio) tra l'insulina presente nel campione e l'insulina marcata con ^{125}I , aggiunta successivamente. Il valore della radioattività legata all'anticorpo risulta pertanto inversamente proporzionale alla concentrazione di antigene presente nel campione o nello standard. Dopo due giorni di incubazione a 4°C, necessari per raggiungere l'equilibrio del sistema, la porzione di insulina legata all'anticorpo è stata separata da quella libera mediante l'aggiunta di una sospensione di carbone attivo inerte in tampone glicina a pH 8.8 in grado di adsorbire i piccoli peptidi e quindi di trattenere solo l'insulina libera e non quella legata all'anticorpo. Dopo centrifugazione per 10 minuti a 2500 g ed eliminazione del sopranatante, la radioattività contenuta nel fondello di carbone, attribuibile all'insulina libera, è stata misurata in un contatore gamma. La curva di taratura è stata ottenuta usando insulina umana come standard. La sensibilità ed i coefficienti di variazione del dosaggio sono stati i seguenti: limite di sensibilità 0.13 ng/ml; variazione intradosaggio 3.1%; variazione interdosaggio 10.2%.

ANALISI STATISTICA. I dati sono espressi come MEDIE \pm ERRORE STANDARD DELLA MEDIA. La significatività statistica dei risultati è stata valutata mediante analisi della varianza (ANOVA); Il test t di Student è stato poi utilizzato per la valutazione della significatività delle differenze fra i vari sottogruppi. Un valore di $P < 0.05$ è stato considerato significativo.

RISULTATI.

1) INCREMENTO DEI LIVELLI INTRACELLULARI DI ACIDO ASCORBICO DOPO LA PREINCUBAZIONE CON ACIDO DEIDROASCORBICO.

La figura 1 mostra i livelli intracellulari di acido ascorbico nelle cellule INS-1E dopo 10, 20 30 minuti di incubazione in mezzo di coltura contenente concentrazioni diverse (0.1, 0.5 e 1.0 mM) di acido deidroascorbico. I risultati ottenuti dimostrano chiaramente che incubando le cellule con DHA 0.5 e 1.0 mM si ottiene un rapido e significativo aumento dei livelli intracellulari di acido ascorbico. E' da notare che tale aumento, per entrambe le dosi di DHA, risulta significativamente maggiore rispetto a quello ottenibile incubando le cellule direttamente con acido ascorbico 1.0 mM. I risultati indicano quindi che il DHA, una volta penetrato nelle cellule, viene rapidamente convertito ad acido ascorbico. Nelle cellule di mammifero tale conversione è catalizzata da diversi enzimi fra i quali nelle cellule di mammifero sembra svolgere un ruolo quantitativamente predominante un enzima appartenente alla famiglia delle glutatione transferasi di classe omega (GSTO-1) dotato di attività deidroascorbato reduttasica (Maellaro et al., 1994; Paolicchi et al.,1994). Abbiamo deciso pertanto di evidenziare la presenza di tale enzima nelle cellule INS-1E mediante tecniche di immunoblotting. La fig. 2 conferma la presenza di tale enzima nella frazione citosolica delle cellule INS-1E, mentre la frazione nucleare ne risulta priva.

2) EFFETTO PROTETTIVO.

Sulla base dei risultati precedenti abbiamo deciso di valutare la citotossicità della diossina sulle cellule INS-1E dopo una preincubazione di 30 minuti con 0.5 e 1.0 mM DHA. I risultati ottenuti, illustrati nella fig. 3, dimostrano chiaramente che l'aumento dei livelli intracellulari di vitamina C ottenuto

attraverso la preincubazione delle cellule con DHA, è in grado di conferire un significativa protezione nei confronti del danno da diossina. Tale protezione risulta particolarmente evidente nel caso della dose più elevata di TCDD (25nM e 50 nM).

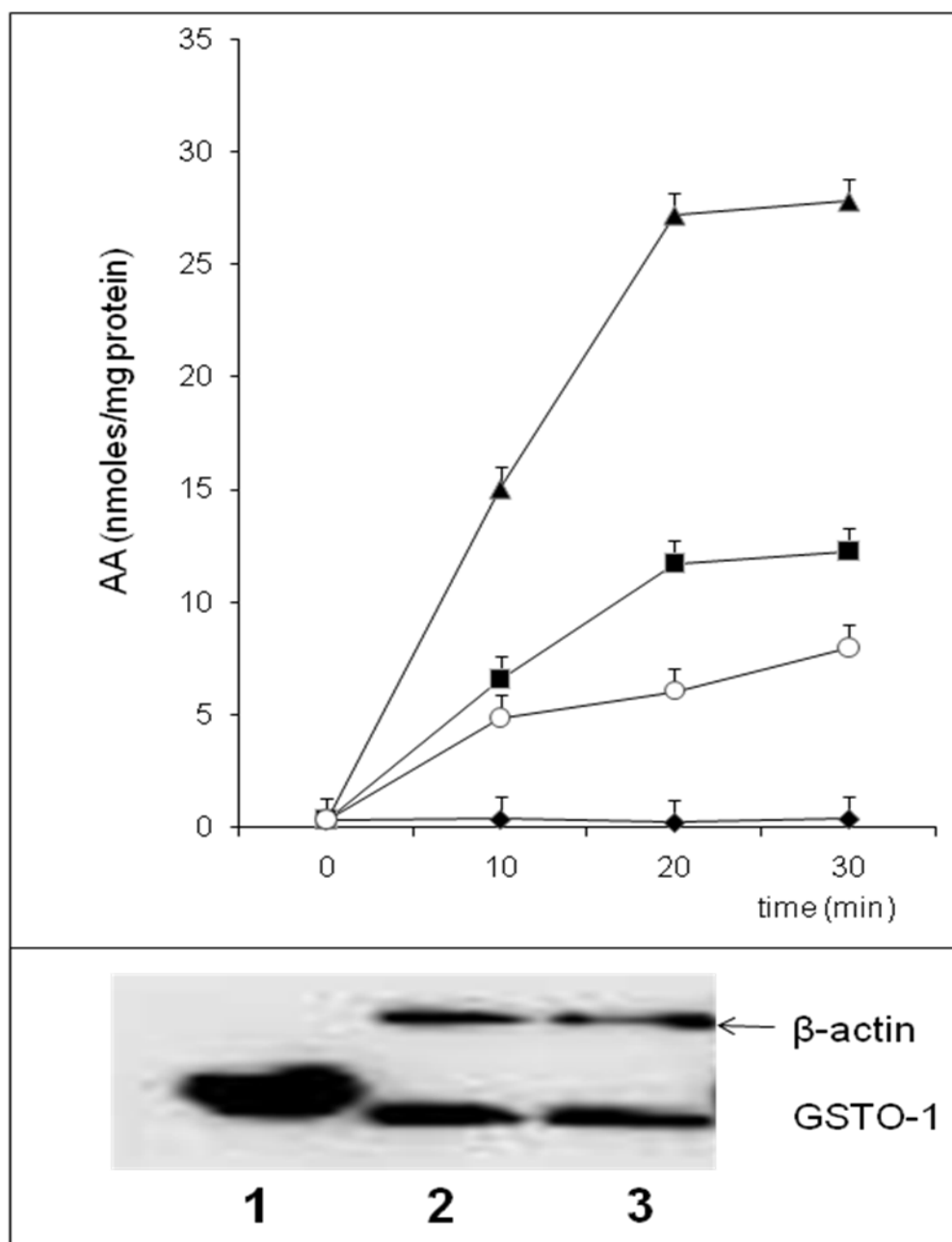


Figura 1. A) Livelli intracellulari di ascorbato in cellule INS-1E incubate per 30 min con 0.1 (♦), 0.5 (■) e 1.0 (▲) mM DHA o 1.0 mM (○) ascorbato. **B)** Immunoblotting della proteina GSTO-1 in cellule INS-1E. 1) GSTO purificata; 2,3) omogenato di cellule INS-1E. In ogni corsia sono stati caricati 15 µg di proteina.

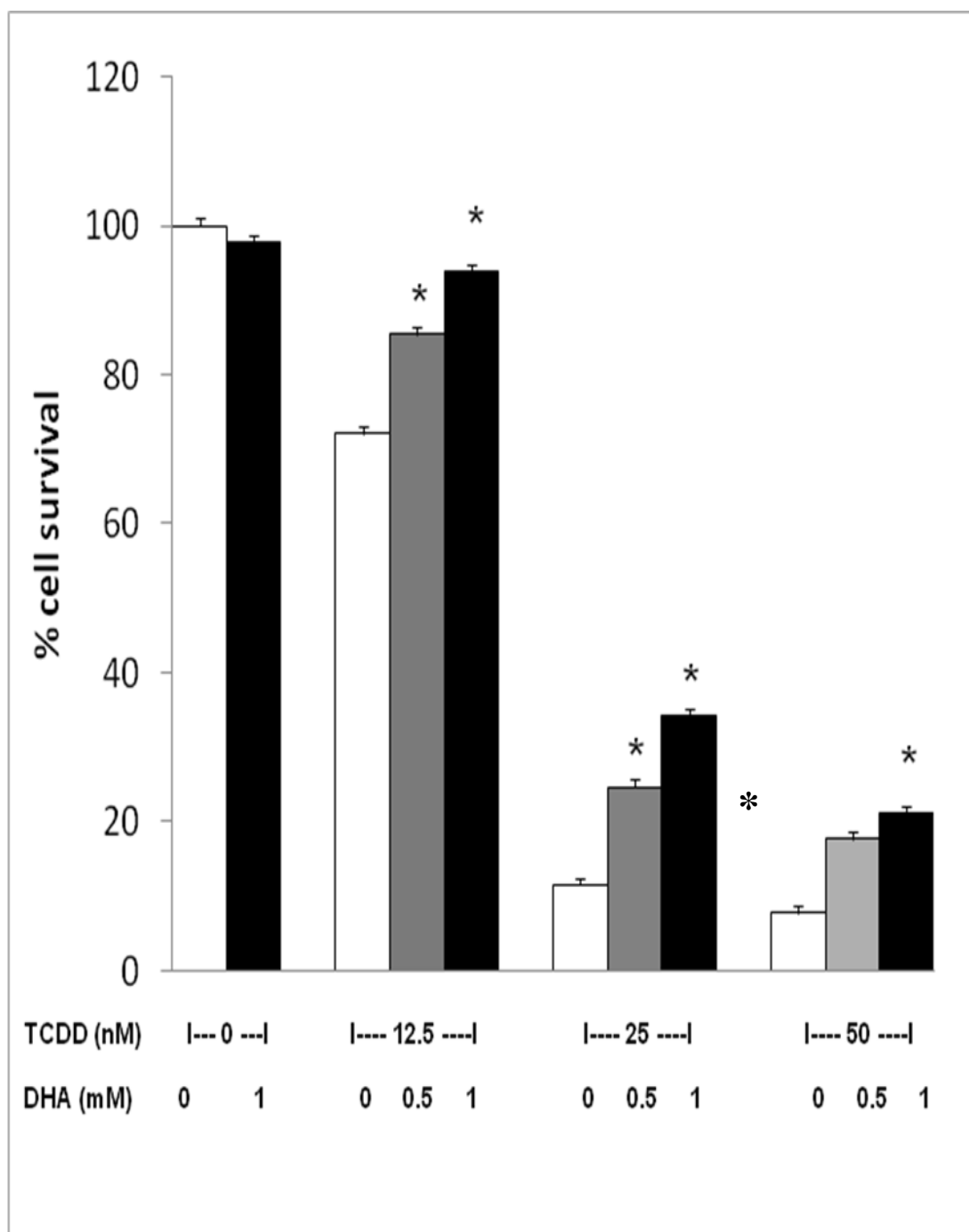


Figura 2. Effetti di una preincubazione di 30 min con DHA 0.5 e 1.0 mM sulla sopravvivenza delle cellule INS-1E dopo 1 ora di esposizione a diverse concentrazioni di TCDD.

* $p < 0.05$ vs le corrispondenti cellule non trattate (Test t di Student).

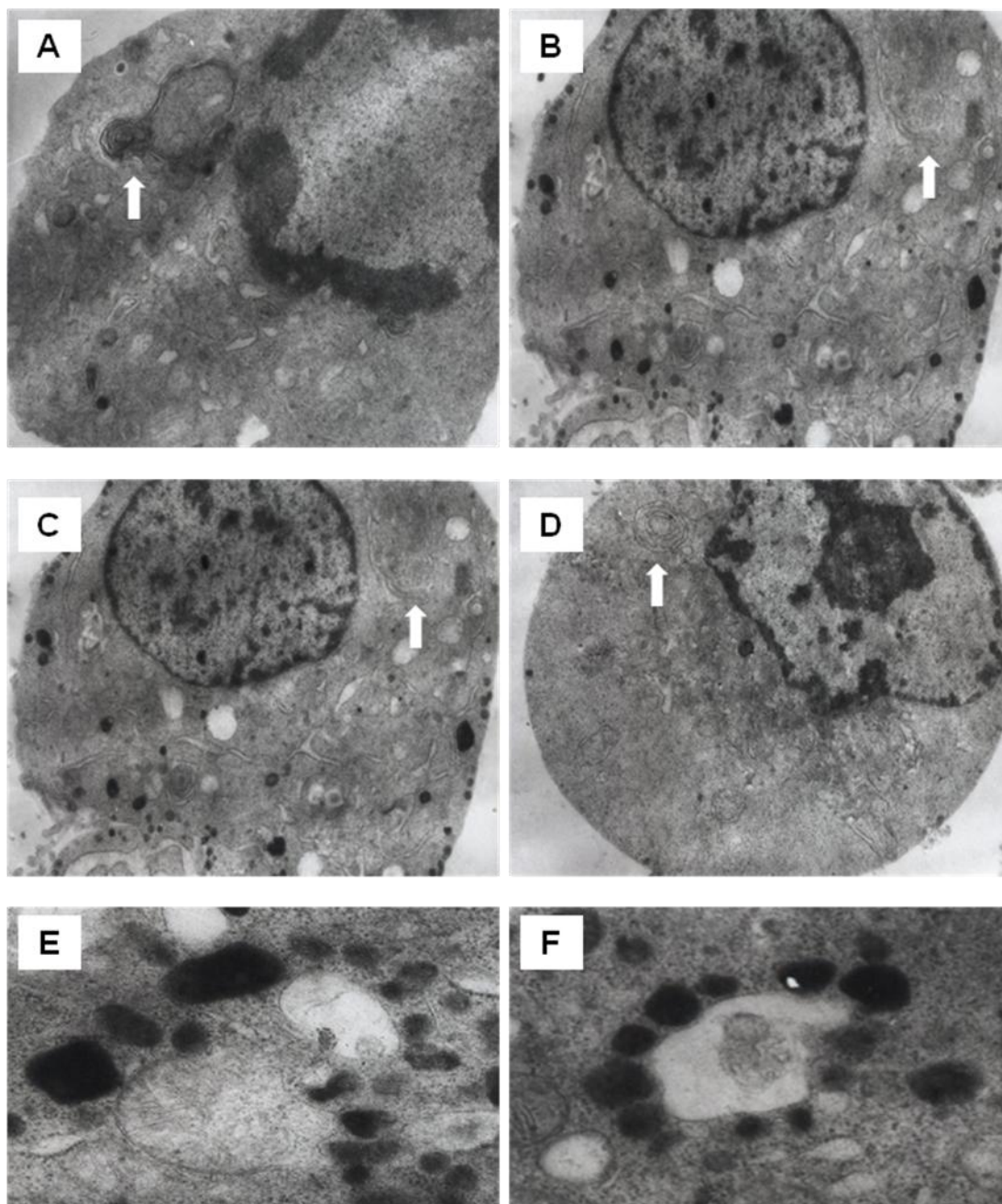


Figura 3. Microscopia elettronica di cellule INS-1E dopo 1 ora di esposizione a dosi diverse di TCDD. **A)** TCDD 12.5 nM (x10000); **B)** TCDD 25 nM (x10000); **C)** TCDD 12.5 nM dopo 30 min con DHA 1 mM (x10000); **D)** TCDD 25 nM dopo 30 min con DHA 1 mM (x10000); **E-F)** TCDD 12.5 nM dopo 30 min con DHA 1 mM (x43000).

Le frecce indicano i vacuoli autofagici.

Precedenti ricerche (Piaggi et al., 2007) avevano dimostrato che la tossicità acuta della diossina nelle cellule INS-1E era caratterizzata da specifiche alterazioni ultrastrutturali. In particolare era stato possibile dimostrare un'intensa attivazione dei processi autofagici indotta dalla diossina, evidenziata dalla presenza nel citoplasma delle cellule di numerosi vacuoli autofagici contenenti spesso mitocondri e residui di membrana sotto forma di figure mieliniche. Abbiamo pertanto deciso di valutare se l'effetto protettivo della preincubazione con DHA fosse o meno associato a variazioni delle alterazioni ultrastrutturali indotte dalla diossina. I risultati ottenuti, illustrati nella fig. 4, indicano che il quadro morfologico ultrastrutturale del danno da diossina nelle cellule INS-1E non risulta significativamente modificato dalla preincubazione con DHA. È da notare però che in molte cellule pretrattate con il DHA sono state rinvenute formazioni riconducibili ad una fase precoce di formazione del autofagolisosoma, che erano invece assenti nelle cellule trattate con la sola diossina. Tale dato, sebbene ancora preliminare e bisognoso di ulteriori conferme, sembrerebbe indicare che il DHA è in grado in qualche modo di rallentare lo sviluppo dei processi autofagici che caratterizzano il danno cellulare indotto dalla diossina.

EFFETTI DI TCDD E DHA SULLA PRODUZIONE DI ROS.

Nonostante l'impiego di due diversi probe fluorescenti (DHR-123 e DCFH-DA) non abbiamo mai evidenziato un'aumentata produzione di ROS nelle cellule di INS-1E. In seguito all'esposizione a dosi diverse di TCDD, almeno nei limiti temporali dei nostri esperimenti (le modificazioni della fluorescenza sono state misurate per 2 ore dopo l'aggiunta di TCDD).

EFFETTO DI TCDD E DHA SUL POTENZIALE DI MEMBRANA DEI MITOCONDRI.

Grazie all'impiego della citofluorimetria, abbiamo confermato che la TCDD è in grado di indurre, dopo 10 minuti dalla sua applicazione e in maniera dose-dipendente, una significativa diminuzione del potenziale di membrana dei mitocondri delle cellule INS-1E (FIG.4, lato sinistro). La preincubazione delle cellule per 30 minuti con DHA 1mM si è rivelato invece in grado di prevenire in maniera significativa la depolarizzazione mitocondriale indotta dalla TCDD. (FIG.4, lato sinistro).

3) SECREZIONE DI INSULINA STIMOLATA DA GLUCOSIO.

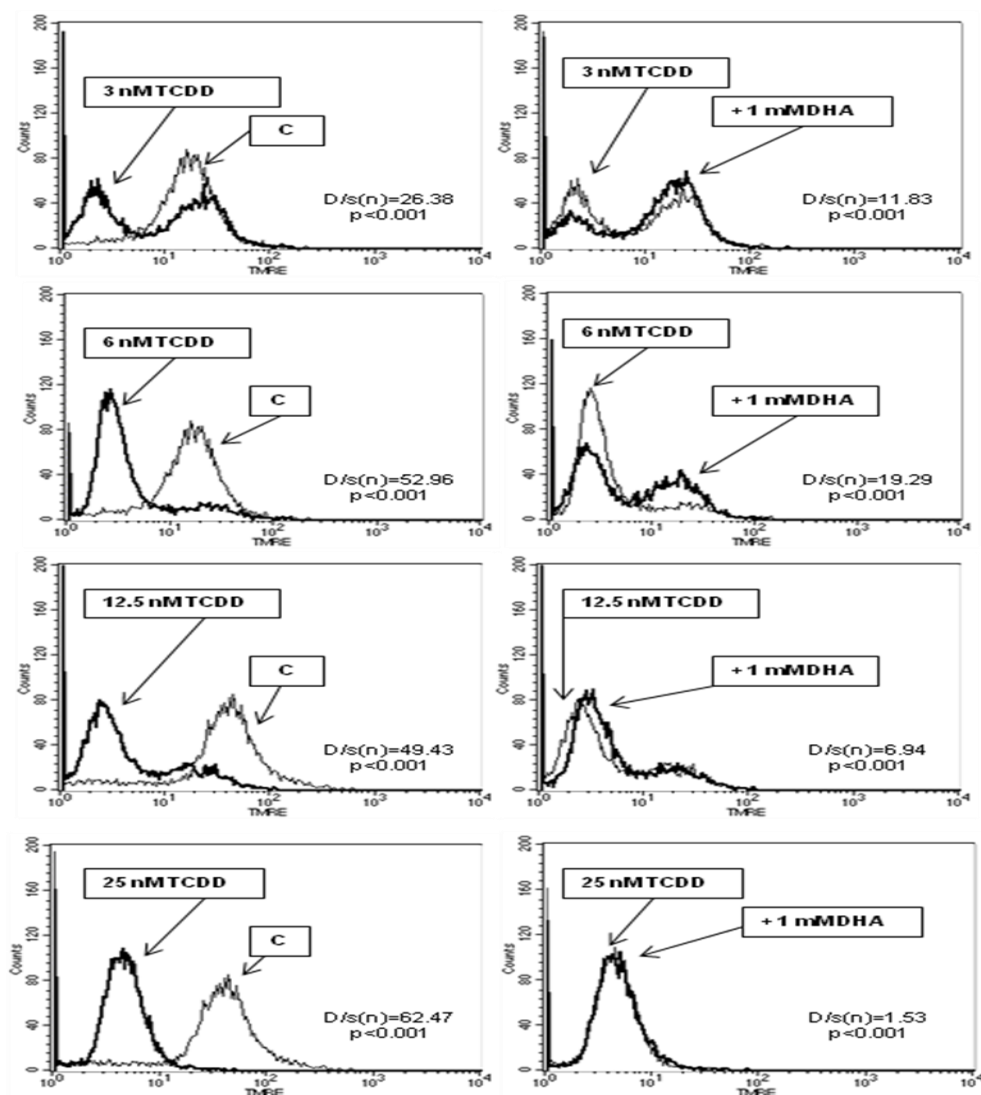


Figura 4

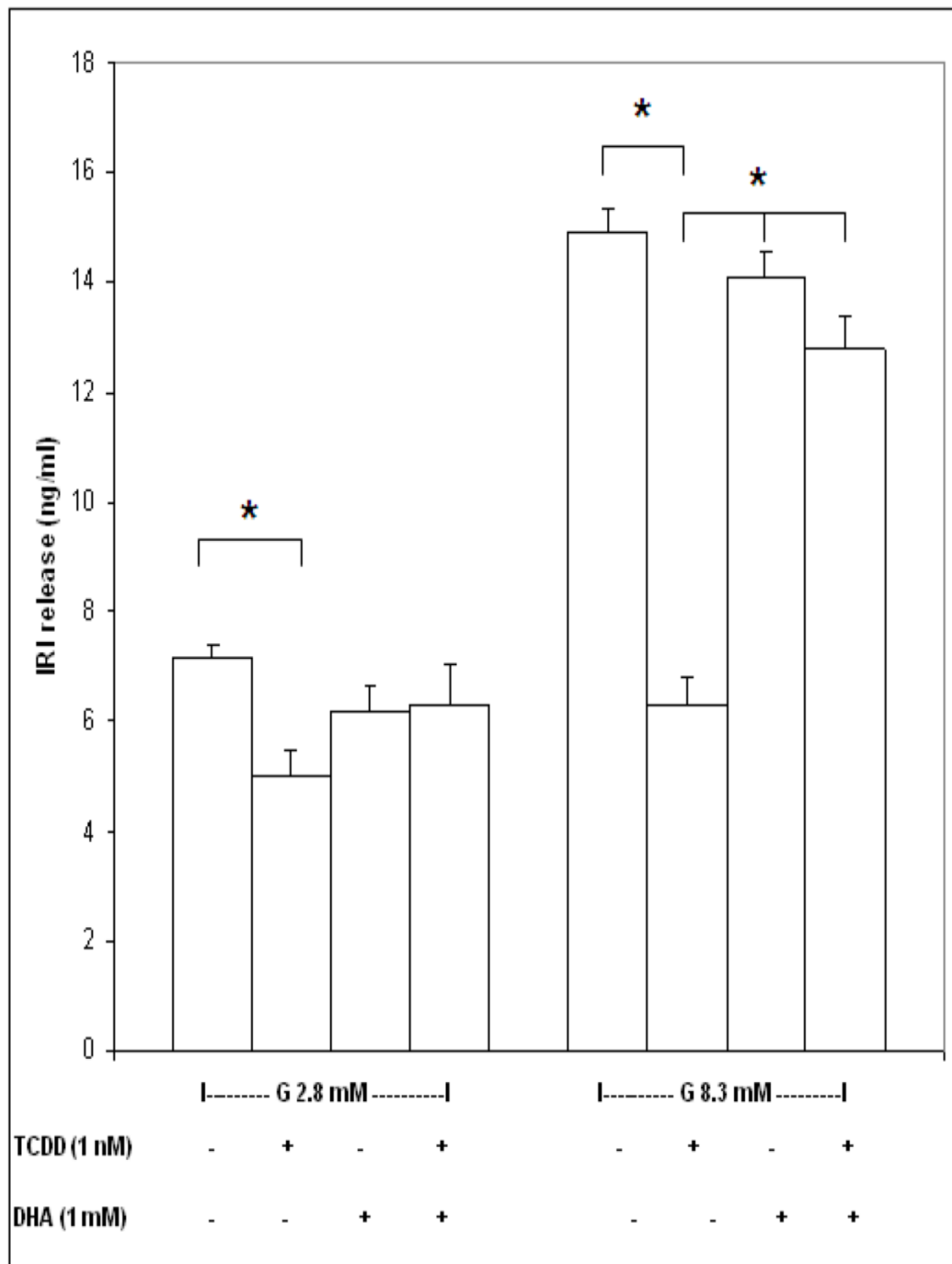


Figura 5. Effetti della preincubazione per 30 min con DHA 1 mM sulla secrezione di insulina stimolata dal glucosio delle cellule INS-1E dopo 1 ora di esposizione a TCDD 1 nM.

* $p < 0.05$ (Test t di Student)

Uno degli effetti più interessanti della diossina sulle cellule INS-1 è la sua capacità di inibire, a dosi molto basse e sicuramente non citotossiche, la secrezione di insulina dopo stimolazione con glucosio (Piaggi. et al., 2007). Abbiamo pertanto pensato di verificare se l'effetto protettivo del DHA si manifestasse anche nei confronti di questo danno funzionale conseguente all'esposizione delle cellule alla diossina. Per questo abbiamo stimolato le cellule INS-1E con due diverse concentrazioni di glucosio (2.8 e 8.3 mM) dopo 30 minuti di preincubazione con 1 mM DHA e successiva esposizione per 1 ora a TCDD 1 nM. Al termine dell'esperimento il tampone di incubazione è stato raccolto al fine di consentire la determinazione dell'insulina secreta dalle cellule mediante radioimmunosaggio. I risultati ottenuti sono illustrati in fig. 5. I risultati ottenuti confermano che la diossina (1 nM) è in grado di inibire in maniera significativa la secrezione di insulina sia in presenza di una concentrazione basale (2.8 mM) che di una concentrazione stimolante (8.3 mM) di glucosio. L'acido deidroascorbico in assenza di diossina non ha effetti significativi sulla secrezione di insulina delle cellule INS-1E, ma riesce invece a prevenire quasi totalmente il declino della secrezione indotto dalla diossina.

DISCUSSIONE.

Il diabete mellito è una patologia che colpisce attualmente più di 170 milioni di persone nel mondo e la sua incidenza risulta in costante aumento: si prevede, infatti, che entro il 2010 il numero dei malati aumenterà di circa il 50%, soprattutto nei paesi in via di sviluppo, come Africa, Asia e Sud America (Zimmet. et al., 2001). Nei paesi più industrializzati, che sono quelli più colpiti, la prevalenza della malattia ha quasi raggiunto il 6% (King. et al., 1998), ma il dato più allarmante è costituito dal fatto che fra gli adolescenti bianchi obesi il 4% è ammalato di diabete, e addirittura il 25% presenta una forma più o meno

grave di intolleranza al glucosio (Sinha. et al., 2002). Una tale crescita del numero dei malati è resa ancora più preoccupante se si considerano le complicazioni associate a questa patologia in particolare i problemi a carico dei sistemi macro-e microvascolare, che sfociano in un'elevata incidenza di malattie cardiovascolari, nefropatie, retinopatia e sono responsabili in larga misura dell'elevata mortalità legata alla malattia (Zimmet. et al., 2001). La forma di gran lunga più comune di diabete, che colpisce circa il 90% degli individui malati è il diabete mellito di tipo 2 (denominato in passato diabete non insulino-dipendente). Nella patogenesi di questa forma di diabete un ruolo essenziale è svolto dalla insulino-resistenza, che consiste nella minore efficacia dell'insulina a livello dei tessuti bersaglio (muscolo, fegato e tessuto adiposo), associata ad inadeguata secrezione di insulina da parte del pancreas. E'ormai largamente accettato che l'insulino-resistenza insorge in seguito allo sviluppo di obesità e alla carenza di esercizio fisico (Boden., 1997; Danforth , 2000; Machann et al., 2004;). Secondo un'interpretazione patogenetica ormai classica (v. ad es. Stumvoll et al., 2005), una condizione prolungata di insulino-resistenza, quale quella determinata dall'obesità, porterebbe in molti casi un esaurimento progressivo delle riserve funzionali del pancreas endocrino, che si manifesterebbe come un'incapacità delle cellule β di mantenere a lungo l'elevata secrezione di insulina necessaria per compensare la ridotta efficacia dell'ormone. Questa incapacità funzionale causerebbe in una fase iniziale soprattutto un aumento dei livelli e della durata dell'iperglicemia postprandiale. Successivamente e in tempi variabili da soggetto a soggetto, l'esposizione prolungata ai livelli di glucosio anche solo temporaneamente elevati, soprattutto se associata ad un aumento dei lipidi circolanti, risulterebbe dannosa per le cellule β , sulla base di un meccanismo che è diventato noto sotto il nome di "glucolipotossicità" (Robertson et al., 2003) e

porterebbe ad ulteriore riduzione della funzione e/o del numero delle cellule β . La combinazione di questi due fattori, insulino-resistenza periferica e danno secondario delle cellule β , sarebbe infine responsabile del definitivo squilibrio dell'omeostasi glucidica con la conseguente comparsa del sintomo principale della malattia diabetica conclamata: l'iperglicemia a digiuno (Stummvoll et al., 2005). Più recentemente, nell'ambito dell'interpretazione patogenetica del diabete di tipo 2, è stato sottolineato il ruolo fondamentale che nello sviluppo della malattia assume la riduzione del numero cellule β pancreatiche produttrici di insulina (Donat and Halban, 2004). Tale riduzione può essere presente precocemente nei pazienti destinati a sviluppare la malattia conclamata, probabilmente su base genetica, ma di solito viene determinata o aggravata da svariati fattori quali ad esempio l'obesità, l'invecchiamento o l'esposizione a fattori tossici ambientali, che possono provocare la progressiva e subdola perdita di cellule β , fino al manifestarsi della malattia conclamata.

In base a tali considerazioni e tenendo conto del progressivo e impressionante aumento dell'incidenza della malattia, nonché di peculiarità della sua distribuzione geografica, diversi Autori hanno avanzato l'ipotesi che, oltre ai fattori di rischio più noti (l'età avanzata, una dieta ipercalorica, la mancanza di esercizio fisico e l'obesità), anche fattori ambientali tossici per le cellule β , ancora poco studiati, possano essere coinvolti nella patogenesi del diabete di tipo 2 (Longnecker and Daniels, 2001; Porta, 2007;). Alla luce di questa nuova ipotesi, assumono particolare interesse numerosi studi epidemiologici che hanno ripetutamente dimostrato l'esistenza di una correlazione positiva fra esposizione alla diossina e insorgenza del diabete di tipo 2 (Henriksen et al., 1997; Bertazzi et al., 1998; Longnecker and Michalek, 2000; Bertazzi et al., 2001; Kim et al., 2003; Fierens et al., 2003; Lee et al., 2006; Fujiyoshi et al., 2006; Kang et al., 2006; Rignell-Hydbom et al., 2007; Lee et al., 2007; Everett et

al., 2007). A questo proposito è anche utile ricordare che le caratteristiche relative all'alta diffusione e all'elevata persistenza della diossina nell'ambiente la fanno ritenere al momento attuale forse l'unico contaminante ambientale capace di causare effetti diffusi sulla popolazione generale (Longnecker and Daniels, 2001). In particolare va ricordato che la diossina e le sostanze ad essa correlate fanno parte di una categoria di contaminanti ambientali noti come "Persistent organic pollutants" (inquinanti organici persistenti). Queste sostanze, grazie alla loro lipofilità e alla loro elevata resistenza alla degradazione, risultano presenti, a basse concentrazioni, nel grasso di molti alimenti (Schafer and Kegley, 2002). Per questo motivo questi inquinanti possono raggiungere praticamente tutti gli individui di una popolazione e pertanto, anche se fossero associati ad un rischio di indurre diabete molto basso a livello individuale, potrebbero comunque manifestare effetti significativi a livello dell'intera popolazione (Porta and Zumeta, 2002).

Nonostante l'interesse teorico suscitato dal possibile legame fra esposizione alla diossina e diabete, le informazioni sperimentali relative alle sue basi biologiche sono ancora relativamente scarse (per una discussione v. ad es. Reimillard and Bunce, 2002). Per questo motivo il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto la mia tesi ha iniziato da alcuni anni a studiare la tossicità della 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD) sulle cellule β pancreatiche responsabili della sintesi e della secrezione di insulina (v.introduzione).

In questo lavoro abbiamo analizzato se un aumento delle concentrazioni intracellulari di acido ascorbico possono proteggere le cellule INS-1E dalla tossicità acuta indotta dalla diossina, che è stato proposto essere mediata, almeno in parte da un incrementata produzione delle specie reattive dell'ossigeno. Le cellule si possono difendere dallo stress ossidativo mediante svariati sistemi antiossidanti, sia quelli enzimatici che non enzimatici. A causa

delle sue proprietà biochimiche (presenza nella cellula di quantità adeguata; capacità di reagire con una varietà di radicali liberi; possibilità di essere rigenerato in forma attiva), l'acido ascorbico è generalmente considerato l'antiossidante perfetto per le cellule di quasi tutti gli organismi aerobi (Arrigoni and De Tullio, 2002). Si presuppone che l'ascorbato agisca neutralizzando i radicali liberi idrosolubili, ed inoltre contribuendo alla riduzione dei radicali lipofilici tocoferoli alla forma di α -tocoferolo (Rose and Bode, 1993). Tuttavia, è opportuno ricordare che almeno alcune delle conseguenze dannose della produzione di radicali liberi può essere efficacemente contrastata dall'acido ascorbico solo a concentrazioni soprafisiologiche (Jackson et al., 1998). Per aggirare le difficoltà di raggiungere e mantenere questo incremento nei livelli intracellulari mediante la somministrazione di ascorbato esogeno, abbiamo usato il suo metabolita ossidato, ovvero l'acido deidroascorbico. Esperimenti in neutrofili hanno dimostrato infatti che la captazione cellulare del deidroascorbato era 30 volte superiore a quella dell'ascorbato (Welch et al., 1995; Washko et al., 1993). Una volta trasportato all'interno della cellula, il deidroascorbato è immediatamente ridotto ad ascorbato, mantenendo in questo modo un gradiente favorevole per accumulazione di ascorbato attraverso questo percorso. L'uptake del deidroascorbato seguito dalla sua riduzione intracellulare può così incrementare i livelli intracellulari di ascorbato da 5 a 20 volte in pochi minuti. Questo processo, denominato "ascorbate recycling" è stato dimostrato sperimentalmente sia nei neutrofili umani, sia in altri tipi di cellule (Welch et al., 1995; Washko et al., 1993; Bigley et al., 1981; Vera et al., 1993; Agus et al., 1999; May et al., 1995).

I nostri risultati hanno dimostrato, per la prima volta, che l'incubazione di cellule INS-1E con svariate concentrazioni di deidroascorbato induce rapidamente un significativo incremento dose-dipendente dei livelli

intracellulari di ascorbato, significativamente maggiore di quello ottenuto incubando le cellule con corrispondenti concentrazioni di ascorbato. Questi risultati sono in accordo con precedenti risultati ottenuti in vivo, che hanno anche dimostrato come la somministrazione di deidroascorbato sia in grado di offrire una migliore protezione contro il danno ossidativo rispetto a quella ottenuta mediante la somministrazione di acido ascorbico esogeno (Huang et al., 2001; De Tata et al., 2005; McNulty et al., 2005; Mack et al., 2006).

Nelle cellule, ci sono svariati sistemi enzimatici capaci di ridurre il deidroascorbato ad acido ascorbico (Maellaro et al., 1994; Wells et al., 1990; Del Bello et al., 1994; Ishikawa et al., 1998; May et al., 1997), la cui funzione fondamentale si ritiene sia quella di ricostituire il potenziale antiossidante dell'ascorbato, mantenendo costante la sua concentrazione sia a livello basale sia durante lo stress ossidativo, indipendentemente dalla sintesi *ex novo* e dall'apporto dietetico. I nostri risultati dimostrano, per la prima volta, che nel citoplasma delle cellule INS-1E uno di questi enzimi, una glutathione transferasi di classe omega con attività deidroascorbato-reduttasica (GSTO-1) (Maellaro et al., 1994; Ishikawa et al., 1998; Board et al., 2000; Whitbread et al., 2005), è presente in grande quantità.

Sulla base di questa analisi preliminare, abbiamo indagato se 30 minuti di preincubazione con 0.5 e 1.0 mM di DHA possono proteggere le cellule INS-1E dalla tossicità acuta causata da un'ora di esposizione a differenti concentrazioni di diossina. I nostri risultati dimostrano che il decremento della vitalità cellulare indotto dalla diossina risulta significativamente prevenuto (sia pure solo in modo parziale) dalla preincubazione con il DHA, in maniera dose-dipendente. In particolare, la sopravvivenza cellulare risulta aumentata di circa 2 e 3 volte, nelle cellule esposte per 1 ora a 25nM di TCDD dopo preincubazione per 30 min con 0.5 e 1 nM di deidroascorbato, rispettivamente.

La microscopia elettronica ha dimostrato che il parziale effetto citoprotettivo del DHA non è correlato con modificazioni significative delle alterazioni ultrastrutturali indotte dall'esposizione alla TCDD nelle cellule INS-1E. La notevole attivazione dei processi di autofagia, che in accordo con precedenti risultati, è una delle più rilevanti alterazioni ultrastrutturali osservate nelle cellule trattate con TCDD, viene infatti ancora osservata nelle cellule preincubate con DHA. Tuttavia, in queste cellule abbiamo spesso osservato numerosi vacuoli ai primi stadi della loro formazione. Quest'osservazione potrebbe essere interpretata come risultato di un ritardo del processo di autofagia a causa della preincubazione di DHA. Chiaramente questa interpretazione ha bisogno di essere ulteriormente verificata da misurazioni morfometriche quantitative.

Una delle ipotesi più diffuse riguardanti il meccanismo dell'azione tossica della diossina fa riferimento alla sua capacità di aumentare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in cellule e tessuti (Stohs, 1990; Yoshida and Ogawa, 2000). Nonostante ciò, nei nostri esperimenti non siamo riusciti a misurare nessun aumento della produzione di ROS nelle cellule INS-1E come conseguenza della loro esposizione alla diossina. A questo proposito, un'analisi della letteratura rivela che prove a favore di uno stress ossidativo indotto dalla diossina sono state ottenute principalmente in vivo in seguito a trattamenti cronici e sub cronici degli animali con la diossina (Shertzer et al., 1998; Slezak et al., 2000; Hassoun et al., 2003; Stohs et al., 1990; Bagchi et al., 1993; Alsharif et al., 1994; Slezak et al., 1999). A livello di culture cellulari invece, lo stress ossidativo indotto dalla TCDD risulta molto meno caratterizzato. Lo stress ossidativo indotto dalla TCDD è stato osservato in svariati tessuti animali dopo trattamenti cronici o sub cronici o alcuni giorni dopo una singola somministrazione in vivo. Un aumento della produzione di ROS indotto dalla

TCDD è stato dimostrato in cellule epiteliali mammarie umane (Chen et al., 2004), in cellule umane di carcinoma mammario (Lin et al., 2007) e in cellule di epatoma (Knerr et al., 2006). Dall'altra parte Lee e collaboratori (2002) hanno riportato che nelle cellule di neuroblastoma umano la diossina può persino reprimere la generazione basale di ROS e inibire la perossidazione lipidica. In effetti, una delle maggiori difficoltà nella comprensione del meccanismo di base della tossicità della diossina è la variabilità dei suoi effetti a seconda delle specie animali, del tipo di organismo e di tessuto, e dello stato metabolico della cellula persino all'interno dello stesso tessuto (Matsumura and Vogel, 2006). Questa variabilità degli effetti tossici della diossina potrebbe essere alla base di alcuni risultati apparentemente contrastanti. A questo proposito è interessante ricordare che in base ad un'ipotesi proposta recentemente (Dong and Matsumura, 2008) sarebbe possibile operare una distinzione nell'ambito dell'azione tossica della diossina fra effetti precoci i "non genomici" ed effetti tardivi o "genomici". In base a questa distinzione gli effetti da noi osservati nelle cellule INS-1E dopo 1 ora di trattamento con TCDD rientrerebbero probabilmente nell'ambito degli effetti non genomici della diossina, mentre invece l'aumentata produzione di ROS potrebbe rappresentare un effetto più tardivo, mediato da un classico meccanismo genomico quale l'aumentata espressione di geni connessi con il metabolismo degli Xenobiotici (citocromo P450) (Chen et al., 2004; Lee et al., 2002) è anche interessante ricordare che per quanto riguarda gli effetti precoci non- genomici, è stato proposto (Dong and Matsumura, 2008) che il meccanismo responsabile della loro attivazione potrebbe essere rappresentato dal rapido aumento dei livelli ultracellulari del calcio prodotti dalla diossina. In effetti, esperimenti condotti in precedenza nel nostro laboratorio (Piaggi et al., 2007) hanno dimostrato che la diossina induce rapidamente (1-10 sec) e in maniera dose dipendente, un drammatico

aumento dei livelli intracellulari di calcio nelle cellule INS-1E. Inoltre, se si blocca l'ingresso del calcio nelle cellule mediante l'aggiunta del chelante EGTA, si riesce a ridurre significativamente la citotossicità della diossina. Il principale bersaglio degli effetti negativi correlati a questo incremento del calcio intracellulare potrebbero probabilmente essere rappresentato dai mitocondri. E' noto infatti che accumulando calcio quando i suoi livelli citosolici sono alti, i mitocondri possono giocare un sottile ruolo nella coordinazione delle complesse vie di segnalazione intracellulare calcio-dipendente (Brookes et al., 2004). D'altro canto, è anche noto che, nonostante il ruolo cruciale nella regolazione delle funzioni mitocondriali, il calcio può anche diventare uno stimolo patologico che può alla fine condurre alla morte apoptotica della cellula. Per spiegare questo apparente paradosso (come il Ca^{2+} possa essere sia un effettore fisiologico che patologico della funzione mitocondriale) è stata avanzata la proposta che il Ca^{2+} possa modulare la produzione intramitocondriale di ROS attraverso svariati meccanismi (stimolazione del ciclo di Krebs e della fosforilazione ossidativa; stimolazione dell'ossido nitrico sintasi; perturbazione dello status antiossidante mitocondriale) (Brookes et al., 2004). A questo proposito, è stato dimostrato che la TCDD può aumentare la produzione mitocondriale di ROS (Senft et al., 2002), probabilmente attraverso una modificazione del rapporto GSSG/GSH (Shen et al., 2005 Shertzer et al., 2006). Con i nostri esperimenti abbiamo dimostrato che la TCDD è capace di indurre rapidamente (10 min) la depolarizzazione della membrana mitocondriale e, cosa ancora più interessante, abbiamo dimostrato che la preincubazione con DHA è capace di proteggere in maniera significativa le cellule INS-1E contro la depolarizzazione mitocondriale indotta dalla TCDD. Sulla base di questi risultati risulta possibile attribuire l'effetto protettivo del DHA alla sua capacità di preservare, almeno parzialmente la funzione

mitocondriale. In accordo con questa ipotesi, abbiamo osservato che la preincubazione con il DHA era capace di prevenire completamente l'effetto inibitorio della TCDD sulla secrezione di insulina stimolata dal glucosio nelle cellule INS-1E. Il meccanismo attraverso il quale la diossina può influenzare negativamente la secrezione di insulina stimolata dal glucosio nelle cellule INS-1E non è conosciuto, ma risultati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio (Piaggi et al., 2007) indicano che le alterazioni mitocondriali potrebbe giocare un ruolo cruciale. Nelle cellule beta, il mitocondrio svolge un ruolo cruciale nell'ambito dell'accoppiamento fisiologico stimolo- secrezione. Nel modello ormai generalmente accettato della secrezione di insulina stimolata dal glucosio, il metabolismo mitocondriale del piruvato, derivato dal glucosio attraverso la via glicolitica, genera ATP, che promuove la chiusura dei canali al K ATP-dipendenti e di conseguenza induce la depolarizzazione della membrana cellulare. L'ingresso del Ca^{2+} attraverso i canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti e l'aumento della concentrazione del Ca^{2+} citosolico scatenano l'esocitosi dell'insulina (Maechler et al., 2006). L'osservazione che il DHA protegge completamente le cellule INS-1E nei confronti dell'inibizione della GSIS indotta da basse concentrazioni di diossina ,il cui effetto di depolarizzazione mitocondriale è completamente prevenuto dal DHA, fornisce un ulteriore supporto all' ipotesi che il mitocondrio potrebbe essere il diretto bersaglio di questi effetti benefici. A questo proposito può essere interessante ricordare che è stato dimostrato (KC et al., 2005) che il DHA penetra nei mitocondri attraverso un processo di trasporto facilitato mediato dal trasportatore GLUT-1, si accumula al loro interno sotto forma di ascorbato, ed è in grado di inibire lo stress ossidativo indotto dal rotenone e di prevenire la depolarizzazione mitocondriale causata dal CCCP. Inoltre, May et al., (2007) hanno recentemente dimostrato che sebbene la concentrazione di ascorbato in

una preparazione di mitocondri isolati sia soltanto intorno a 0.2 mM, se si aggiungono alla preparazione succinato 6 mM e DHA 1 mM, i mitocondri risultano capaci di arrivare e mantenere concentrazioni di ascorbato fino a 4mM e nello stesso tempo di rilasciare ascorbato nel mezzo di incubazione.

In conclusione, i nostri studi dimostrano che gli effetti acuti, “non genomici” della diossina sulla vitalità e sulla funzione delle cellule INS-1E non sono probabilmente mediate da un aumento della produzione intracellulare di ROS. Per contro, in accordo con precedenti osservazioni, i nostri risultati indicano che il mitocondrio può essere principale bersaglio dell’effetto tossico della diossina, probabilmente come conseguenza del fatto che la diossina induce un rapido e significativo aumento della concentrazione del calcio intracellulare. La preincubazione con il DHA, con il conseguente aumento dei livelli intracellulari di ascorbato, sembra proteggere le cellule INS-1E contro la tossicità acuta della diossina mediante una parziale protezione della funzione mitocondriale.

BIBLIOGRAFIA

Bertazzi P. A. et al., 1998; Consonni D, Pesatori AC, Zocchetti C. et al., Mortality in a population exposed to dioxin after the Seveso, Italy, accident in 1976: 25 years of follow-up. AM. J. EPIDEMIOLOG, 167:847-858, 2008.

Nishiumi S, Yabuschita Y, Furuyashiki T, et al., Involvement of SREBPs in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced disruption of lipid metabolism in male guinea pig. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., 229: 281-289, 2008) e quello muscolare (MAX SR, Silbergeld EK, Skeletal muscle glucocorticoid receptor and glutamine synthetase activity in the wasting syndrome in rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., 87:523-527, 1987.

Lindén J et al., Korkalainen M, Lensu S, Toumisto J, Pohjanvirta R, Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and leptin on hypothalamic mRNA expression of factors participating in food intake regulation in a TCDD-sensitive and a TCDD-resistant rat strain-J. BIOCHEM.MOL.TOXICOL., 19:139-148, 2005.

Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH et al., Control of Treg and Th17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor- NATURE, 453:65-72, 2008.

Veldhoen M., Hirota K, Westendorp AM et al., the aryl hydrocarbon receptor links Th17 cell-mediated autoimmunity to environmental toxins-NATURE, 453: 106-110, 2008.

Boverhof DR, Kwekel JC, Humes DG et al., Dioxin induces an estrogen-like, estrogen receptor-dependent gene expression response in the murine uterus-MOL.PHARMACOL., 69:1599-1606, 2006.

Ohtake F., Takeyama K, Matsumoto T. et al., Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. NATURE, 423: 545-550, 2003.

Beischlag TV, Perdue GH, ER alpha-AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription-J. BIOL.CHEM., 280:21607-11, 2005.

Brunnberg S, Petterson K, Rudin E et al., the basic helix-loop helix PAS protein ARNT functions as a potent coactivator of estrogen receptor-dependent transcription-PROC.NATL. ACAD.SCI. USA, 100:6517-6522, 2003.

Ohtake F et al., Baba A, Fujii- Kuriyama Y, Kato S., Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxin with sex hormone signalling. BIOCHEM. BIOPHYS. RES.COMMUN,.....2008.

Bertazzi P.A., Pesatori AC, Bernucci I. et al., Dioxin exposure and human leukemias and lymphomas. Lessons from the Seveso accident and studies on industrial workers. LEUKEMIA, 13 (suppl1): 572-574, 1999.

Henriksen G.L. et al., 1997 Bertazzi P.A. et al., 1998; Longnecker M. P. and Michalek J. E., 2000; Bertazzi P.A. et al., 2001; Kim J.S. et al., 2003; Fierens S. et al., 2003; Lee D-H et al., 2006; Fujiyoshi P. T. et al., 2006; Kang H.K. et al., 2006; Ringnell Hydbom A. et al., 2007; Lee T-H et al., 2007; Everett C. J. et al., 2007.

Mullerowà D, Kopeckyj, white adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants- PHISOL, RES, 56:375-8381, 2007.

Huang J, Agus DB, Winfree CJ, Kiss S, Mack WJ, Mc Taggard RA, Choudri TF, Kim LJ, Mocco J, Pinsky DJ, Fox WD, Israel RJ, Boyd TA, Golde DW, Connolly ES jr 2001, Dehydroascorbic acid, a blood- brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 98:11720-117240.

De Tata V, Brizzi S, Saviozzi M, Lazzarotti A, Fierabracci V, Malvaldi G, Casini A 2005, Protective role of dehydroascorbate in rat liver ischemia-reperfusion injury. J. Surg. Res., 123:215-221.

McNulty AL, Stabler TV, Vail TP, McDaniel GE, Kraus VB 2005. Dehydroascorbate transport in human chondrocytes is regulated by hypoxia and is a physiologically relevant source of ascorbic acid in the joint. Arthritis. Rheum., 52:2676-2685.

Mack WJ, Mocco J, Ducruet AF, Laufer I, King RG, Zhang Y, Guo W, Pinsky DJ, Connolly ES JR 2006. A cerebroprotective dose of intravenous citrate/ sorbitol-stabilized dehydroascorbic acid is correlated with increased cerebral ascorbic

acid and inhibited lipid peroxidative after murine reperfused stroke
NEUROSURGERY, 59: 383-388.